Isolierung und Konstitution des Artemisetins, eines neuen Flavonols.

Auszug
der

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung der Doktorwürde
verfasst und
der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Otto Isaac
aus
Monschau/Eifel
1955

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündl. Prüfung:
15. Dez. 1955

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie in der Zeit vom 1.Nov.1953 bis zum 17.Nov.1955 von mir ausgeführt und zusammengestellt.

Herrn Professor Dr.R.Dietzel sage ich für die mir angediehene Leitung und wertvolle Anregungen meinen aufrichtigen Dank. Desgleichen danke ich Herrn Dr.P.Tunmann für zahlreiche Ratschläge und Anregungen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0145

Im Jahre 1898 isolierten MM.ADRIAN und A.TRILLAT (1) aus Artemisia Absinthium L. einen in gelben Nadeln kristallisierenden Stoff $C_{52}H_{51}O_{20}$ oder $C_{53}H_{51}O_{20}$, Fp.165°. Die Bearbeitung dieses interessanten Stoffes hatte seine chemische Charakterisierung zum Ziele, um damit auch zur Abrundung des pharmakologischen Wirkungsbildes der Droge beizutragen.

Die damalige Gewinnung des Stoffes war zweifellos unzweckmässig; die Arbeitsweise muß eine Veränderung der ursprünglichen Substanz befürchten lassen. Deshalb mussten schonendere Methoden zur Isolierung herangezogen werden.

Die Herstellung des alkoholischen Extraktes erfolgt in vorliegender Arbeit durch Evakolation der Droge. Da glykosidische Stoffe in wasserhaltigen Lösungsmitteln durch die anwesenden Pflanzensäuren in der Wärme desöfteren zersetzt werden, wird im Vakuum unter Zusatz von Calciumcarbonat eingedampft. Nach Fällung der Ballaststoffe mit neutralem Bleiazetat und Bleihydroxyd wird der Alkohol abdestilliert und die wässerige Phase mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wird nach dem Trocknen eingedampft und der Rückstand in Benzol aufgenommen. Die Benzollösung wird einer Fällung mit Petroläther unterworfen. Aus dem Filtrat kristallisiert nach dem Eindampfen ein Stoff in gelben Prismen, die nach wiederholtem Umkristallisieren aus Methanol bei 168°(KOFLER) schmelzen. Für den Stoff wird die Bezeichnung "Artemisetin" vorgeschlagen.

Die physikalischen Eigenschaften entsprechen der von MM.ADRIAN und A.TRILLAT (1) isolierten Substanz. Das M.G. beträgt jedoch nicht 1002 (Kryoskopie in Bromoform), sondern 388,4 (RAST). Aus den Analysenzahlen ergibt sich die Formel $C_{20}H_{20}O_8$. Das Artemisetin ist stickstoffrei und optisch inaktiv. Das Absorptionsspektrum zeigt zwei Maxima bei 290 mμ ($\log\varepsilon$:4,30) und 343 mμ ($\log\varepsilon$:4,32) sowie eine Schulter bei 252 mμ ($\log\varepsilon$:4,24).

Artemisetin färbt sich mit Alkalien intensiv gelb, eine Eigenschaft, die nach T.A.GEISSMAN (2) polyphenolischen Carbonylverbindungen wie Flavonen, Flavanonen, Chalconen und Xanthonen eigentümlich ist. Diese Gruppen lassen sich durch Reduktionsproben weiter unterscheiden. Die Flavone und Flavanone werden zu Anthocyanidinen reduziert.

Artemisetin lässt sich mit Magnesium und Salzsäure zu einem rotgefärbten Produkt reduzieren; alkalische Reduktion ist dagegen nicht möglich. Nach Y.ASAHINA und M.INUBUSE (3) ist dieses Verhalten

charakteristisch für Flavonolderivate; denn Flavone sind nur durch Natriumamalgam, Flavanone aber sowohl in saurer als auch in alkalischer Lösung reduzierbar. Die Rotfärbung des Reduktionsproduktes beruht nach J.SHINODA (4) auf einer Seitenphenyl-Substitution. Die Reduktion des Artemisetins lässt sich auch mit Zink und Salzsäure durchführen. Nach M.SHIMIZU (5) ist damit die Hydroxylgruppe am Kohlenstoff 3 als verätherт oder glykosidiert anzusehen. Eine Glykosidierung ist aber beim Artemisetin nicht anzunehmen, da sich das Reduktionsprodukt in Octanol ausschütteln lässt und dies bei Flavonolglykosiden nach E.F.BRYANT (6) nicht möglich ist. Auf Grund der Reduktionsversuche ist mithin Artemisetin als Oxyflavonol mit verätherter C_3-Hydroxylgruppe anzusehen.

Bei der Azetylierung entsteht ein Monoazetylprodukt vom Fp.173°. Es kristallisiert aus Petroläther/Benzol in farblosen Nadeln. Sein M.G. beträgt 430,4 (RAST). Die Analysenwerte passen auf die Formel $C_{22}H_{22}O_9$. Da Artemisetin weiterhin auf Grund der Methoxylbestimmung nach ZEISEL 5 Methoxylgruppen enthält, ist es ein Monoxy-pentamethoxy-flavon.

Die Stellung der freien Hydroxylgruppe lässt sich bei Monoxy-poly-alkoxy-flavonen durch die Farbreaktion mit Eisen-3-chlorid festlegen, wenn sich das Hydroxyl am Kohlenstoff 3,5 oder 8 befindet. Die Grünfärbung der äthanolischen Artemisetinlösung mit Eisen-3-chlorid weist der freien Hydroxylgruppe die 5-Stellung zu. Dieser Befund lässt sich papierchromatographisch erhärten. Nach L.HÖRHAMMER und R.HÄNSEL (7) reagieren Flavone und Flavonole unterschiedlich gegen Zirkonoxychlorid-Zitronensäure. Bei 5-Oxyflavonen sowie 5-Oxyflavonolen mit substituiertem 3-Hydroxyl bilden sich nach dem Besprühen mit Zirkonoxychloridlösung intensiv gelbe Metallkomplexe, die mit Zitronensäure spaltbar sind. Flavonole mit freier Hydroxylgruppe am Kohlenstoff 3 bilden zwar auch Komplexe mit Zirkonoxychlorid; diese sind jedoch gegen Zitronensäure beständig. Artemisetin reagiert aber mit Zirkonoxychlorid unter Bildung eines Komplexes, der beim Besprühen mit Zitronensäure zerfällt. Die Bildung des weniger stabilen Metallkomplexes rührt also von einer freien Hydroxylgruppe in 5-Stellung her. Die Stellung der freien Hydroxylgruppe lässt sich nach C.NORDSTRÖM und T.SWAIN (8) in bestimmten Fällen auch aus der Lage der Absorptionsbänder alkalischer Flavonlösungen bestimmen. Das Absorptionsmaximum des Artemisetins in alkalischer Lösung liegt wie das des alkalisierten 5-Oxyflavon-7,3',4'-trimethyläthers bei 290 mμ und beweist somit die

Position der freien Hydroxylgruppe am C_5. Erfahrungsgemäß bedingt die geringe Azidität des Hydroxyls in 5-Stellung, welches nach S.ARANOFF (9) koordinativ mit der Carbonylgruppe in peri-Stellung verbunden ist, daß bei natürlich vorkommenden partiell methylierten Polyoxyflavonen das 5-Hydroxyl frei ist.

Die Lage der am Seitenphenyl stehenden Substituenten wird aus den für diese charakteristischen Absorptionsbändern aufgeklärt. So wird das Erscheinen eines dritten, längerwelligen Bandes zwischen 3oo mμ und 4oo mμ sowohl durch eine Seitenphenyl-Substitution als auch durch ein freies Hydroxyl am Kohlenstoff 3 bedingt. Das durch die 3-Hydroxylgruppe verursachte Band verschwindet bei Methylierung, Glykosidierung usw. wieder. Da beim Artemisetin schon eine methylierte 3-Hydroxylgruppe nachgewiesen ist, muß das Erscheinen des dritten Bandes durch eine Seitenphenyl-Substitution verursacht sein. Nach T.A.GEISSMAN und E.HINREINER (1o) befinden sich die Seitenphenyl-Hydroxylgruppen bei natürlich vorkommenden Flavonen meistens in 3',4' oder 5'-Stellung. In seltenen Fällen ist auch eine 2'-Substitution nachgewiesen worden. Nach B.SKARZYNSKI (11) besitzt das 4'-Hydroxyl ein Maximum bei 323 mμ. Eine 2',4'-Substitution bedingt ein Band bei 334 mμ und eine 3',4'-Stellung ein Maximum bei 348 mμ. Da die Methylierung des 4'-Hydroxyls einen geringfügigen hypsochromen Effekt auslöst, ist anzunehmen, daß das dritte Band des Artemisetins bei 343 mμ auf eine Substitution der 3',4'-Stellung zurückzuführen ist. Ungeklärt bleibt dabei allerdings die Möglichkeit einer zusätzlichen 5'-Substitution, da diese auf das Spektrum unreduzierter Flavone keinen Einfluß nimmt. Bei den Anthocyanen lässt sich dagegen eine solche 5'-Substitution erkennen. K.HAYASHI (12) hat sich eingehend mit dem Einfluß der Seitenphenyl-Substitution auf das Spektrum der Anthocyane beschäftigt. Nach seinen Angaben bedingt die 4'-Substitution das Erscheinen eines Zwischenbandes bei der Frequenz 3ooo bis 33oo. Dieses Band verschwindet jedoch bei zusätzlicher 3'-Substitution. Kommt aber zur 3',4'-Substitution noch eine 5'-Substitution, so wird der Einfluß des 3'-Hydroxyls aufgehoben, und das Zwischenband tritt wieder in Erscheinung. Da das Reduktionsprodukt des Artemisetins kein solches Zwischenband aufweist, ist die Möglichkeit einer 5'-Substitution ausgeschlossen. Durch die Alkalisierungsreaktion und die Eisen-3-chloridprobe nach L.HÖRHAMMER und K.MÜLLER (13), die beide negativ verlaufen, wird bestätigt, daß die Hydroxylgruppen an der Seitenphenylgruppe methyliert sind.

Schwieriger sind bei Polyoxyflavonen die optischen Auswirkungen der Benzopyronkern-Substituenten auf das Spektrum zu erklären, da die Substitutionen in 5- und 7-Stellung eventuelle Substitutionen am C_6 und C_8 überlagern. Durch Azetylierung wird der weitgehende Einfluß der freien 5-Hydroxylgruppe auf das Spektrum ausgeschaltet. Das Spektrum des reduzierten Azetyl-Artemisetins stimmt mit dem des reduzierten Fisetins (3,7,3',4'-Tetraoxyflavon) überein. Wird dabei berücksichtigt, daß nach der Reduktion kein optischer Unterschied mehr zwischen einer freien Hydroxylgruppe und einem Methyläther am C_3 bestehen kann, da die Carbonylgruppe durch die Reduktion wegfällt, so werden die Spektren der Reduktionsprodukte des Fisetins und des Azetyl-Artemisetins identisch sein müssen, wenn zu letzterem neben der 3',4'-Substitution eine 7-Substitution hinzutritt. Infolge der grossen Ähnlichkeit beider Spektren ist eine Substitution der 7-Stellung des Artemisetins anzunehmen.

Unklar bleibt zunächst die Frage der sechsten Substitution am Artemisetinmolekül, die sowohl in 6- als auch in 8-Stellung vorliegen kann. Die Beantwortung gelingt durch den BARGELLINI-Test, der eine vicinale Stellung anzeigt. Da Artemisetin positiv auf diesen Test reagiert und die Substitution am C_5 sicher ist, kann sich die fehlende Methoxylgruppe nur am Kohlenstoff 6 befinden.

Da die Aufklärung der Konstitution hauptsächlich durch Interpretierung der Absorptionsspektren erfolgte, und diese bei der Bestimmung eines unbekannten polysubstituierten Flavons erstmalig in diesem Umfange durchgeführt wurde, war es erforderlich, die gefundenen Stellungen der Substituenten auch auf anderem Wege zu beweisen. Wenn die angegebenen Positionen stimmen, muß es möglich sein, durch geeignete Reaktionen aus dem Artemisetin ein bekanntes Flavon bzw.Derivate davon herzustellen und zu identifizieren. Bei der Methylierung des Artemisetins, die durch die besondere Lage der 5-Hydroxylgruppe in peri-Stellung zum Carbonylsauerstoff erschwert wird, entsteht ein Stoff, der in farblosen, prismatischen Kristallen vom Fp.157° (KOFLER) kristallisiert. Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und Absorptionsmaxima erweisen die Identität mit dem von L.H.BRIGGS und R.H.LOCKER (14) beschriebenen Querzetagetin-hexamethyläther. Die Entmethylierung des Artemisetins führt zum Querzetagetin, dessen Identität durch den Zersetzungspunkt von 320° und die charakteristischen Absorptionsmaxima festgestellt wird. Durch Azetylierung des entmethylierten Artemisetins entsteht das Querzetagetin-hexazetat, das mit authentischem übereinstimmt.

So besitzt das von MM.ADRIAN und A.TRILLAT (1) erstmals aus Artemisia Absinthium L. isolierte Artemisetin die Struktur eines 5-Oxy-3,6,7,3',4'-pentamethoxyflavons. Ein Flavon der bezeichneten Formel ist bisher unbekannt.

Durch histochemische Versuche ist das Artemisetin vorwiegend in der Epidermis der Wermutblätter aufgefunden worden. Es ist anzunehmen, daß die Häufung des Flavons in den peripheren Gewebsteilen zum Schutz gegen übermässige Ultraviolettbestrahlung dient.

Beschreibung der Versuche.

Isolierung. 5 kg Droge werden im Evakolator mit 95%igem Äthanol erschöpfend extrahiert und das gesammelte Extrakt im Vakuum unter Zusatz von 25,0 g Calciumcarbonat auf 1000 ml eingedampft. Hierzu werden 1000 ml einer gesättigten Lösung von neutralem Bleiazetat in 70%igem Äthanol gegeben. Das Filtrat wird mit frisch gefälltem Bleihydroxyd behandelt und die von Ballaststoffen befreite Lösung schliesslich durch Schwefelwasserstoff entbleit. Äthanol wird abdestilliert und die wässerige Phase, deren Volumen ca.300 ml beträgt, mit insgesamt 2000 ml Äther in Anteilen von 100 ml ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wird über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird mit 500 ml Benzol aufgenommen und die Benzollösung in 1300 ml Petroläther eingerührt. Das Filtrat wird auf 200 ml eingedampft. Nach kurzer Zeit bilden sich in der Lösung gelbe, prismatische Kristalle, die nach wiederholtem Umkristallisieren aus Methanol bei 168° schmelzen.

Zur Analyse wird die Substanz bei 78° getrocknet im Vakuum über Phosphorpentoxyd.

Artemisetin $C_{20}H_{20}O_8$ (388,4)	C	H	$-OCH_3$
Ber.:	61,84%	5,19%	39,70%
Gef.:	61,54%	5,32%	39,09%

Molekulargewichtsbestimmung des Artemisetins. Die Bestimmung wird nach K.RAST, modifiziert von W.MÜNSTER, durchgeführt und gibt bei 5 Einwaagen mit je 10 Einzelmessungen ein Molekulargewicht von 384,5 (ber.388,4).

Methylierung des Artemisetins. 50 mg Artemisetin werden am Rückflußkühler 6 Stunden lang mit 5 ml trockenem Azeton, 1,0 g wasserfreiem Kaliumcarbonat und 0,1 ml Dimethylsulfat erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird aus Äthanol umkristallisiert und hat einen Fp.von 157°. Die Ausbeute beträgt 30 mg an reiner Substanz. Schmelz- und Mischschmelzpunkt stimmen mit authentischem Querzetagetin-hexamethyläther überein.

Entmethylierung des Artemisetins. 50 mg Artemisetin werden am Rückflußkühler 2 Stunden lang mit 3 ml Jodwasserstoffsäure auf einem Paraffinbad unter Zusatz von 1,5 ml Phenol und 0,5 ml Essigsäure-

anhydrid im Kohlendioxydstrom bei 150°(Badtemperatur) erhitzt. Durch Fällung mit Wasser und Umkristallisieren aus wässerigem Äthanol (2:1) wird ein Produkt erhalten, das in gelben Nadeln kristallisiert und sich bei 320° zersetzt. Durch Beimischung von authentischem Querzetagetin tritt keine Depression ein. Die Ausbeute beträgt 35 mg.

Azetylierung des entmethylierten Artemisetins. Das Entmethylierungsprodukt des Artemisetins (30 mg) wird mit 0,2 ml Essigsäureanhydrid und 1 Tropfen wasserfreiem Pyridin 1/2 Stunde lang erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird mit Wasser gefällt. Nach dem Umkristallisieren aus Äthanol bilden sich lange, farblose Nadeln vom Fp.212°. Die Ausbeute beträgt 5 mg. Die Angaben stimmen mit authentischem Querzetagetin-hexamethyläther überein.

Azetylierung des Artemisetins. 78 mg Artemisetin werden mit 1,5 ml Essigsäureanhydrid und 1,5 ml wasserfreiem Pyridin 1/2 Stunde lang erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird mit Wasser gefällt und aus Benzol/Petroläther umkristallisiert. Das Azetylprodukt kristallisiert in langen, farblosen Nadeln vom Fp.173-5°.
Zur Analyse wird das Azetylprodukt des Artemisetins 24 Stunden lang im Vakuum bei 78° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Azetyl-Artemisetin.
$C_{22}H_{22}O_9$ (430,4)

	C	H
Ber.:	61,39%	5,16%
Gef.:	61,11%	5,26%

Die Molekulargewichtsbestimmung des Azetyl-Artemisetins (nach K.RAST, modifiziert von W.MÜNSTER) ergibt bei 3 Einwaagen mit je 10 Einzelmessungen ein durchschnittliches M.G.von 427,3 (ber. 430,4).

Papierchromatographische Untersuchung. Zur Verwendung kommen SCHLEICHER & SCHÜLL - Papiere 2043 b mgl, senkrecht zur Faserrichtung geschnitten. Es wird nach der absteigenden Methode entwickelt. Als Lösungsmittel dienen Butanol-Eisessig-Wasser im Volumverhältnis 4:1:5 und Essigester-Ameisensäure-Wasser im Verhältnis 10:2:3. Die Laufdauer beträgt 24 bzw.12 Stunden.
Die Rf-Werte betragen für Artemisetin im Butanolgemisch 0,85 und im Essigestergemisch 0,95 (t=18°C). Die Abweichungen der Rf-Werte belaufen sich auf maximal ± 0,02.

Zirkonoxychlorid-Zitronensäure-Test. Das entwickelte Chromatogramm wird mit einer 2%igen Lösung von Zirkonoxychlorid in Methanol besprüht, die Flecken werden nach dem Trocknen markiert und dann kräftig mit 5%iger wässeriger Zitronensäurelösung besprüht. Die markierten und gelöschten Zonen werden herausgeschnitten und 2 Minuten lang der Einwirkung 25%iger kochender Salzsäure ausgesetzt.

Messung der Absorptionsspektren. Die Aufnahme der Spektren erfolgt bei 19°C im UNICAM-Spektrophotometer (Schichtdicke=1 cm). Die unreduzierten Flavone werden in 10^{-4}molarer äthanolischer Lösung gemessen. Für die Aufnahme der Spektren der Reduktionsprodukte wird eine 10^{-3} molare äthanolische Lösung hergestellt und davon werden 5 ml abpipettiert. Die Reduktion erfolgt unter guter Kühlung mit 0,1 g Magnesium und 1 ml konz.Salzsäure. Ungefähr 2 Stunden nach der ersten Säurezugabe ist die Reduktion beendet. Die Messung erfolgt sofort nach Beendigung der H_2-Entwicklung. Als Vergleichslösung dient eine Lösung von 0,1 g Mg in 1 ml HCl und 5 ml Äthanol. Zur Messung des Alkalispektrums dient eine Lösung in 0,002 molarer äthanolischer NaOH.

Literaturverzeichnis.

(1) MM.ADRIAN und A.TRILLAT, C.r.hebd.Séances Acad.Sci.127,874 (1898).

(2) T.A.GEISSMAN in K.PAECH und M.V.TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, 3.Bd. Springer-Verlag, Berlin 1955.

(3) Y.ASAHINA und M.INUBUSE, Ber.dtsch.chem.Ges.61,1647 (1928).

(4) J.SHINODA, J.Pharmac.Soc.Japan (Yakugakuzasshi) 48, 35 (1928).

(5) M.SHIMIZU, J.Pharmac.Soc.Japan (Yakugakuzasshi) 71,1329 (1951).

(6) E.F.BRYANT, J.Americ.Pharm.Assoc. 39, 48o (195o).

(7) L.HÖRHAMMER und R.HÄNSEL, Arch.Pharm.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 287, 31o (1954).

(8) C.NORDSTRÖM und R.SWAIN, J.Chem.Soc.(London) 1953, 2772.

(9) S.ARANOFF, J.Org.Chemistr.5, 561 (194o).

(1o) T.A.GEISSMAN und E.HINREINER, Botan.Rev.18, 77 (1952).

(11) B.SKARZYNSKI, Biochem.Z. 3o1, 15o (1939).

(12) K.HAYASHI, Act.Phytochim. 7, 143 (1933).

(13) L.HÖRHAMMER und K.MÜLLER, Arch.Pharm.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 287, 376 (1954).

(14) L.H.BRIGGS und R.H.LOCKER, J.Chem.Soc.(London) 1949, 2162.

RUDOLF BAEHR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG KOLPINGSTRASSE 3